

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**“Evaluación de la influencia del meropenem en la
formación de piocianina y alginato en pseudomonas
aeruginosa formadora de biopelícula”**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de
Químico Farmacéutico**

AUTOR

Delia Graciela Oyola Salcedo

ASESORES

María Elena Salazar Salvatierra

Lima – Perú

2014

Dedicateria

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre Clara.

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que la caracteriza y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mi abuelos Delia y Francisco

Quienes me enseñaron a dar los primeros pasos con amor y firmeza.

A mi compañero Alex

Por el apoyo, comprensión e infinito amor.

Agradecimiento

Al Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiológica y Biotecnológica “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, que me brindó todas las facilidades para el desarrollo de esta investigación y en especial a los Doctores del Instituto.

A mi asesora María Elena Salazar Salvatierra por sus valiosos consejos, aportes y recomendaciones.

A los distinguidos Miembros del Jurado:

Dr. Víctor Crispín Pérez

Dr. Juan Manuel Parreño Tipian

Mg. Mirtha Roque Alcarraz

Q.F. Robert Almonacid Román

Que con sus observaciones y sugerencias me ayudaron a culminar la elaboración del presente trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN

SUMMARY

I. INTRODUCCIÓN	2
II. MARCO TEÓRICO	5
1. BIOPELÍCULAS BACTERIANAS	5
1.1. Definición	5
1.2. Origen de las biopelículas	6
1.3. Estructura de las biopelículas	7
1.4. Fase de desarrollo de las biopelículas	8
1.5. Resistencia de las biopelículas	13
1.6. Biopelículas y enfermedades	16
2. GÉNERO <i>Pseudomonas</i>	17
2.1. Definición y morfología	17
2.2. Clasificación científica	18
2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
2.4. Hábitat	18
2.5. Factores de virulencia	19
2.5.1. Alginato	19
2.5.2. Piocianina	21
2.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y la formación de biopelículas	22
2.7. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el campo hospitalario	22
3. MEROPENEM	23
3.1. Farmacodinamia	23
3.2. Farmacocinética	24
III. PARTE EXPERIMENTAL	26
1. Material biológico	26
2. Materiales, equipos y reactivos	26
3. Metodología de trabajo	28
3.1. Recolección de la muestra	28

3.2. Evaluación de la producción de piocianina en cepas <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
3.3. Selección de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> formadoras de biopelículas	29
3.4. Ensayo para la cuantificación de piocianina	29
3.5. Ensayo para la cuantificación de alginato	30
 IV. RESULTADOS	
1. Resultados de las cepas <i>Pseudomonas aeruginosa</i> formadoras de piocianina	31
2. Resultados de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> formadoras de biopelículas	33
3. Resultados de la cuantificación de piocianina	36
4. Resultados de la cuantificación de alginato	40
 V. DISCUSIÓN	44
 VI. CONCLUSIONES	46
 VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Superficies bióticas y abióticas colonizadas por biopelículas	5
Figura 2. Estructuras de las biopelículas, exopolisacárido y microcanales.	7
Figura 3. Fases de desarrollo de las biopelículas	10
Figura 4. Fijación de bacterias sobre el epitelio y emisión de señales químicas	11
Figura 5. Gen Alg8 y la biosíntesis del alginato	20
Figura 6. Biosíntesis del alginato	21
Figura 7. Mecanismo propuesto para la síntesis de piocianina en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
Figura 8. Estructura química del meropenem	25
Figura 9. Agar cetrimide	33
Figura 10. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> formadora de biopelícula	33
Figura 11. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> no formadora de biopelícula	34
Figura 12. Cepas formadoras de biopelículas	36
Figura 13. Concentración de piocianina de 6.01 – 6.59ug/mL	38
Figura 14. Producción de piocianina	39
Figura 15. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con meropenem	39
Figura 16. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sin meropenem	39
Figura 17. Concentración de estándar de ácido úrico vs absorbancia	42
Figura18. Cuantificación de ácido úrico de 6ug/mL – 10ugL	42
Figura 19. Producción de alginato en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables importantes en la formación de biopelículas	9
Tabla 2. Infecciones humanas relacionadas con la formación de biopelículas	17
Tabla 3. Clasificación científica	18
Tabla 4. Criterios para establecer la categoría de diferentes bacterias a la acción del meropenem (CLSI)	25
Tabla 5. Formación de piocianina en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
Tabla 6. Resultados de cepas formadoras de biopelículas en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	34
Tabla 7. Cuantificación espectrofotométrica de producción de piocianina por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en 60 cepas formadoras de biopelícula.	36
Tabla 8. Resultados de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> formadoras de alginato.	40

RESUMEN

La presente tesis tuvo como objetivo principal evaluar la influencia del meropenem en la formación de piocianina y alginato por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* formadoras de biopelículas. Se detectó un 75% (60/80) de cepas formadoras de biopelículas por el método de O'Toole - Kolter de 80 aislados provenientes de pacientes de los Hospitales Nacionales Edgardo Rebagliati Martins y Guillermo Almenara Irigoyen, de las cuales el 30.0% (18/60) evidenciaron producción de piocianina en una concentración de 6.0 ug/mL a 6.5 ug/mL y el 36.6% (22/60) se evidenció producción de alginato en concentraciones de 6 ug/mL a 10 ug/mL expresado como ácido urónico en presencia de meropenem a la concentración de 10 µg . Sin embargo en ausencia de meropenem se obtuvo una menor producción de piocianina y alginato, por lo que se comprobó que el pigmento de piocianina y la producción de alginato son mecanismos de virulencia que favorecen la supervivencia de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia del antibiótico.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, biopelícula, piocianina, alginato.

SUMMARY

This thesis had as main objective to evaluate the influence of meropenem in the forming of pyocyanin and alginate by *Pseudomonas aeruginosa* biofilm forming. 75% (60/80) of biofilm-forming strains were detected by the method of O'Toole - Kolter 80 isolates from patients of the Edgardo Rebagliati Martins and Guillermo Almenara Irigoyen National Hospital, of which 30.0% (18 / 60) showed pyocyanin production in a concentration of 6.0 ug / mL 6.5 ug / mL and 36.6% (22/60) showed production of alginate in concentrations of 6 ug / ml to 10 ug / mL expressed as uronic acid in the presence of meropenem in concentrations of 10 µg. However in the absence of meropenem decreased production of pyocyanin and alginate was obtained, so that it is found that the pigment pyocyanin production and alginate are virulence mechanisms that promote survival of *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of the antibiotic.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, pyocyanin, alginate.

I. INTRODUCCIÓN

Un nuevo informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) reveló que la resistencia microbiana ha dejado de ser una previsión para el futuro y es ya en todas las regiones del mundo una realidad que puede afectar a cualquier persona de todas las edades y de diferentes países. La resistencia microbiana es la pérdida de la sensibilidad de un microorganismo a un antimicrobiano al que originalmente era susceptible, de tal forma que los tratamientos convencionales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten, lo que incrementa el riesgo de propagación. La evolución de las cepas resistentes es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos se ven expuestos a fármacos antimicrobianos, y es posible un intercambio de características de resistencia entre ciertos tipos de bacterias.

La *Pseudomonas aeruginosa*, es el patógeno humano más importante del género *Pseudomonas*, caracterizado por su alta virulencia y morbimortalidad. Tradicionalmente considerado como un patógeno oportunista asociado a múltiples infecciones intrahospitalarias, provoca infecciones graves y potencialmente mortales en pacientes inmunocomprometidos, como en los pacientes con problemas en las vías respiratorias, quemaduras, sometidos a quimioterapia, y también se asocia con neumonía crónica en pacientes con fibrosis quísticas.

Los carbapenémicos como imipenem y meropenem son los fármacos de elección para tratamiento de las infecciones causadas por *P. aeruginosa*. Sin embargo, la frecuencia de aislamientos de cepas resistentes a estos medicamentos se ha incrementado considerablemente en todo el mundo y

en América Latina, incluyendo Perú donde la prevalencia de infecciones por *P. aeruginosa* resistente a los carbapenémicos ha crecido más rápidamente que en otras regiones.

Esta bacteria, se ha establecido como un organismo modelo para estudiar la formación de biopelículas bacterianas como resistencia a los antimicrobianos. Al menos tres exopolisacáridos (alginate, Psl y Pel) contribuyen a la formación de biopelículas en este microorganismo. La mutación deficiente en la producción de uno o más de estos polisacáridos permitieron el surgimiento de la investigación de cómo estos polímeros contribuyen de forma interactiva para la formación de biopelículas.

La piocianina es el principal compuesto de la fenazina producido por *P. aeruginosa*, que funciona tanto como un importante factor de virulencia. Esta fenazina producida por *P. aeruginosa* en la fibrosis quística pulmonar, inhibe la función ciliar de células epiteliales respiratorias y puede alterar la respuesta inmune e inflamatoria del huésped.

La falla de los tratamientos con antibióticos frente a *Pseudomonas aeruginosa* y el desconocimiento con exactitud de los mecanismos implicados en la resistencia, hace que sea necesaria la investigación de otros mecanismos, muy diferentes a los enzimáticos, los que pueden contribuir a que bacterias oportunistas como *Pseudomonas aeruginosa* presente resistencia frente a diferentes antibióticos.

La presente investigación fue realizada para determinar los factores de virulencia que están involucrados en la formación de biopelículas y contribuir de esta manera al conocimiento de otros mecanismos de resistencia antimicrobiana.

Por lo mencionado, los objetivos planteados para este trabajo fueron:

1.1 Objetivo General

Evaluar la influencia del meropenem en la formación de piocianina y alginato por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* formadoras de biopelículas.

1.2 Objetivos Específicos

- a) Evaluar la capacidad de formación de biopelículas de las cepas.
- b) Evaluar la capacidad de producción del pigmento de piocianina y alginato en ausencia y presencia de meropenem.

II. MARCO TEÓRICO

1. Biopelículas bacterianas

1.1 Definición

Las biopelículas son la forma de crecimiento más frecuente de las bacterias y se definió en un principio como una comunidad de bacterias adheridas a una superficie sólida e inmersa en un medio líquido ⁽¹⁾. Posteriormente, Costerton definió las biopelículas como: «una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se hallan unidas a un substrato o superficie, o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes» ⁽²⁾.

La capacidad de formar biopelículas no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas y por su inigualable versatilidad metabólica todos los microorganismos son capaces de hacerlo, ya que pueden colonizar superficies bióticas, abióticas, hidrófobas o hidrófilas de cualquier ambiente ^(1,3).

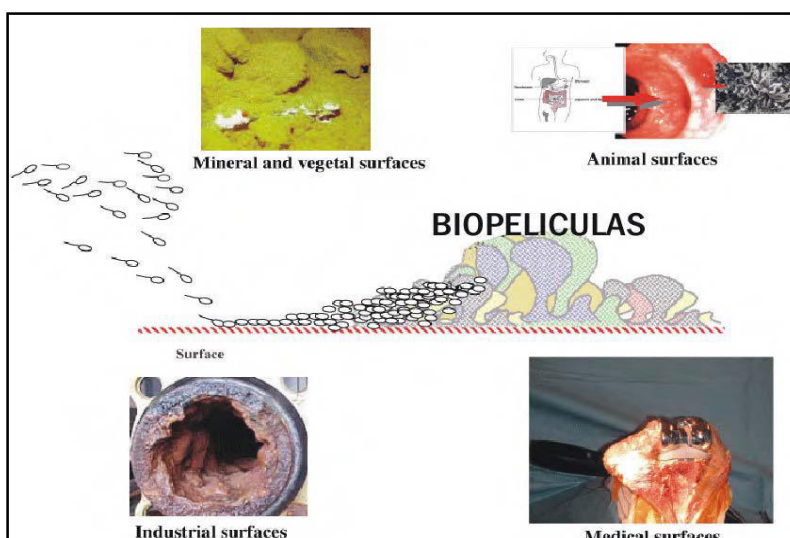


FIGURA 1. SUPERFICIES BIOTICAS Y ABIOTICAS COLONIZADAS POR BIOPELÍCULAS ⁽¹⁾

Existen diferencias en la composición de la matriz de las biopelículas de acuerdo al tipo de superficie abiótica donde se forman como por ejemplo: las que se forman en el sistema de agua, son muy complejas ya que contiene productos de corrosión, material de arcilla, y bacterias filamentosas ⁽³⁾.

1.2. Origen de las biopelículas

Las biopelículas pueden desarrollarse por medio de dos tipos de procesos:

1.2.1. A partir de una célula planctónica

Ciertas bacterias tienen la capacidad de desarrollar estructuras de superficie que favorecen la adhesión de las mismas, tales como fimbrias y fibrillas. Otros factores que favorecen la adhesión de las bacterias a una superficie son la capacidad que muestran algunas especies bacterianas para el movimiento, como la *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, o la expresión de ciertas proteínas en su superficie celular denominadas adhesinas. Una vez que las bacterias están ya adheridas se produce la expresión de ciertos genes que las diferencian de las formas planctónicas. Posteriormente se produce la multiplicación bacteriana y la coagregación con otras especies ⁽³⁾.

1.2.2 A partir de otra biopelícula

Se pueden desarrollar a partir de células sueltas desprendidas de otras biopelículas o de partes de la misma. En cualquier caso, estas células desprendidas mantendrían todas las propiedades de las biopelículas de donde procedan ⁽⁴⁾.

1.3 Estructura de las biopelículas

Las biopelículas están constituidas por tres componentes:

1.3.1 Masa celular

La cual puede estar formada por una sola especie o por múltiples especies microbiológicas, que representan un 15% - 20% del volumen ⁽⁴⁾.

1.3.2 Espacios intercelulares o canales

Dentro de la matriz de las biopelículas puede observarse las distintas comunidades bacterianas organizadas, separadas entre sí por microcanales ^(4,5) los cuales permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno hasta las zonas más profundas de las biopelículas, pero la existencia de estos canales no evita que dentro de las biopelículas podamos encontrar ambientes diferentes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno son diferentes ^(6, 7,8).

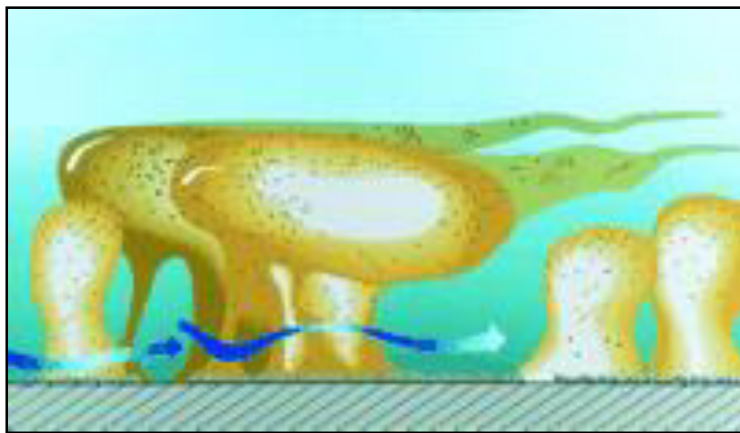


FIGURA 2. ESTRUCTURAS DE LAS BIOPELÍCULAS / EXOPOLISACÁRIDO Y MICROCANALES ⁽⁵⁾

1.3.3 Matriz extracelular

Representa el 75% - 80%, está compuesta por una mezcla de exopolisacáridos, proteínas, sales minerales y material celular ⁽³⁾. Los exopolisacáridos representan el componente fundamental de la matriz y participan de forma fundamental en el desarrollo de las biopelículas porque

mantienen su integridad. Pueden tener carga neutra o carga polianiónica, e interactuar con distintos antimicrobianos, desinfectantes o biocidas, los cuales quedan atrapados en la matriz sin capacidad para actuar sobre las bacterias, pueden también actuar como fuente de nutrientes para otras bacterias o atrapar otros nutrientes del medio y ofrecerlos a los distintos tipos bacterianos presentes en la biopelícula. La composición química y la estructura terciaria del exopolisacárido pueden determinar la capacidad de adhesión de las bacterias a las diferentes superficies.

También actúan como protectores de condiciones de stress ambiental como rayos ultravioletas, cambios de pH, shock osmótico y evitan su desecación. La pérdida o alteración de un determinado polisacárido puede alterar la biopelícula, o incluso puede producir la desaparición de la misma ⁽⁹⁾.

1.4 Fases de desarrollo de las biopelículas

Para el proceso de la formación de biopelículas, existen una variedad de interacciones físicas y metabólicas necesarias para la adhesión, crecimiento y supervivencia, además de aumentar la resistencia de estos grupos a ambientes hostiles para su desarrollo. La biopelículas han sido descritas en hábitats que van desde ambientes acuáticos, superficies de plantas, suelo, aparatos médicos, sistemas de filtración hasta el tracto digestivo de humanos y animales ^(1,10).

La capacidad de la célula para realizar este ataque depende de factores ambientales como la temperatura, pH y de factores genéticos que codifican las funciones motrices, la sensibilidad ambiental, las adhesinas y otras proteínas ^(11,12). Se han identificado cinco fases en el desarrollo de una biopelícula:

1.4.1 Acondicionamiento de la superficie

Las bacterias son capaces de formar biopelículas gracias a que previamente entran en contacto con la materia orgánica presente en el agua, haciendo que estas se depositen en la interfase agua/superficie para cambiar las propiedades químicas y físicas de la misma y mejorar las posibilidades de la fijación bacteriana.

Existen factores externos que afectan la adhesión de las bacterias, por un lado factores físicos como su rugosidad, químicos de la superficie y por el otro los factores del medio líquido en el que se desarrolla, como la velocidad del flujo y la composición química del mismo, ^(4,13) además de la capacidad de unirse a diversos plásticos, cristal, metales, que depende de las proteínas de su cubierta y de los apéndices motrices.

TABLA 1. VARIABLES IMPORTANTES EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS ⁽¹³⁾

Propiedades del sustrato	Propiedades del fluido	Propiedades de la Células
Textura o rugosidad Hidrofobicidad Condiciones de la película	Velocidad del fluido pH Temperatura Presencia de cationes	Hidrofobicidad de la superficie celular Fimbrias Flagelos Sustancias poliméricas extracelulares o agentes antimicrobianos

Estudios recientes muestran que el acero inoxidable puede ser tan susceptible como el plástico, ya que por acción del aire o de la humedad se empieza a crear una capa de óxido de cromo sobre su superficie dando lugar a la acumulación de la suciedad orgánica, pre-acondicionando el sustrato para la adhesión bacteriana ⁽¹⁴⁾.

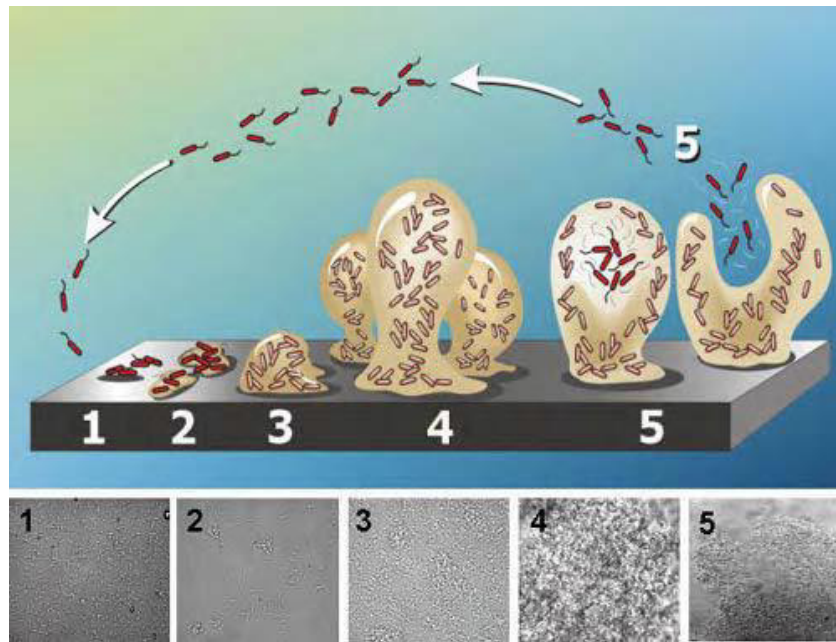


FIGURA 3. FASES DE DESARROLLO DE LAS BIOPELICULAS ⁽¹⁵⁾

1.4.2 Adherencia bacteriana

a. Adherencia reversible o primaria

La adhesión primaria de bacterias a una superficie o a un sustrato puede ser de dos maneras:

- Activa: Gracias a los flagelos, las fimbrias, las adhesinas, las cápsulas y cargas de superficie, las bacterias pueden alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas.
- Pasiva: Aunque la motilidad ayuda al proceso, igual las bacterias cuentan con la gravedad, difusión y dinámica de fluidos para poder adherirse a cualquier superficie.

Las bacterias que encuentran la superficie acondicionada, forman con ella una unión reversible que depende de las cargas eléctricas de la bacteria, son atracciones de tipo electrostático o hidrófobo y fuerzas de Van der Waals, sin unión química, pero igual favorecen la unión a proteínas, glucoproteínas, o los

receptores de polisacáridos sobre la superficie del huésped (tejidos) o de los implantes médicos (prótesis valvulares, ortopédicas, etc.) ⁽¹⁵⁾

b.- Adherencia irreversible o secundaria

La unión irreversible significa el anclaje de apéndices bacterianos y la producción de exopolisacárido, de esta forma la bacteria consolida el proceso de adhesión y forma un complejo con el material superficial y receptores, mediante sus ligandos específicos ⁽¹⁵⁾.

Cuando se termina esta fase las biopelículas son difíciles de erradicar de cualquier superficie, tejidos, acero inoxidable, material médico, y mientras más tiempo tenga de formado será más difícil su erradicación.



FIGURA 4. FIJACIÓN DE BACTERIAS SOBRE EL EPITELIO Y EMISIÓN DE SEÑALES QUÍMICAS ⁽¹⁵⁾

1.4.3 Maduración: matriz extracelular

Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie comienza a dividirse y así permite iniciar la fabricación de una mezcla de polímeros que excreta al exterior para mantener unidas las células, entre ellas y con la superficie. El exopolisacárido es excretado desde la pared celular bacteriana y su estructura a partir de grupos de polisacáridos neutros o portadores de cargas eléctricas, que suman a la adherencia, la capacidad de actuar como un sistema de intercambio iónico para atrapar y concentrar los nutrientes que encuentre. La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía desde alginato en *P. aeruginosa*, celulosa en *S. typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *V. cholerae* hasta poly-N-acetilglucosamina en *S. aureus*. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz de la biopelícula. Así, algunas cepas de *P. aeruginosa* son capaces de producir además de alginato un polisacárido rico en glucosa que forma una película en la interfase medio aire al que se ha denominado “Pellican” ⁽¹⁶⁾.

1.4.4 Cooperación entre especies

Dentro del exopolisacárido de las biopelículas se pueden encontrar otras especies, estas pueden haber quedado atrapadas en la matriz extracelular por captación física o atracción electrostática, pero las diferentes especies viven en un nicho mínimo especializado. Si una especie genera residuos tóxicos la otra los devorará con avidez, así se consigue coordinar los recursos bioquímicos de todos los habitantes de la biopelícula.

1.4.5 Crecimiento y Dispersión

La colonia en división continua libera residuos y nutrientes que podrán utilizarse para acondicionar la nueva superficie y para alimentar a otras células. Si las condiciones de flujo hídrico lo permiten, el equilibrio que se establece entre el crecimiento de la colonia y el movimiento del agua libera pocas células, pero con un flujo intenso o turbulento se pueden liberar muchas más ⁽¹⁷⁾.

1.5 Resistencia de las biopelículas

Se ha podido demostrar que las células de las biopelículas pueden resultar entre 10 y 1000 veces más resistentes, que las células planctónicas correspondientes a un gran número de antibióticos de amplio espectro (ampicilina, estreptomicina, tetraciclinas, gentamicina, meropenem, etc.) ⁽¹⁸⁾ y de biocidas oxidantes del tipo del cloro, el yodo o el ozono. En la actualidad se está trabajando mucho para controlar las infecciones bacterianas, pero es conocido que tenemos dos tipos de resistencia bacteriana, las bacterias que son resistentes a los medicamentos causadas por alguna mutación de genes y las bacterias que crecen dentro de biopelículas presentando gran resistencia frente a biocidas, desinfectantes o antimicrobianos que las células que viven en forma planctónica.

La resistencia es la habilidad de un microorganismo para crecer en presencia de una elevada concentración de antimicrobiano o un pequeño grupo de cepas en las cuales la concentración mínima inhibitoria (MIC) se ha incrementado, pero en las biopelículas se entiende como un incremento de la resistencia de las células atacadas ⁽¹⁹⁾. Los mecanismos por los cuales se hacen más resistentes aún no son completamente claros; pero se han considerado los siguientes:

1.5.1 Penetración restringida y degradación de antibióticos

La penetración es restringida debido a la presencia del exopolisacárido de la matriz que limita la difusión de sustancias y la unión del antimicrobiano proporcionando una efectiva resistencia a las células en su interior. La obstaculización de la difusión es probablemente efectiva contra pequeños péptidos antimicrobianos de numerosas defensinas, por otra parte, la carga negativa de los exopolisacáridos es muy efectiva contra antibióticos cargados positivamente como los aminoglucósidos, por presentar restricción de la permeabilidad durante toda la unión ⁽¹⁹⁾.

1.5.2 Baja tasa de crecimiento

Generalmente todos los antibióticos son muy efectivos en el ataque rápido de las células en crecimiento, condición que es absolutamente requerida por algunos antibióticos para poder atacar.

La penicilina y ampicilina no atacan células que no estén en crecimiento y la tasa de ataque es proporcional a la tasa de crecimiento. Algunos de los más avanzados β -lactámicos, como cefalosporinas, aminoglucósidos y fluoroquinolonas pueden atacar células en fase estacionaria, pero ellos son indistintamente más efectivos en el ataque rápido de células en división.

Otro mecanismo por el cual la disminución del crecimiento contribuye a la resistencia de las biopelículas es el gradiente químico que se establece dentro, el oxígeno es conocido por modular la acción de los aminoglucósidos y los gradientes de pH pueden impactar negativamente la eficiencia de los antibióticos ⁽¹⁹⁾.

1.5.3 Persistencia y tolerancia bacteriana

Es el último factor considerado recientemente, las biopelículas de las bacterias no solo evaden el ataque de los antibióticos, también resisten a los desinfectantes químicos. La persistencia de una población de células puede considerarse por su extensa resistencia gracias a las células persistentes que son altamente protectoras y puede deberse a:

- La dimensión bifásica de la biopelícula, en el cual gran parte de la población es atacada rápidamente pero una pequeña fracción de células no es afectada aún con un prolongado tratamiento con antibióticos.
- Los genes que contribuyen a la persistencia codifican proteínas que actúan como circuitos reguladores que determinan la entrada y el éxito de este estado como la buena y específica respuesta protectora.
- Los antibióticos bacteriostáticos que inhiben el crecimiento paradójicamente contribuyen a la persistencia y a la preservación de la biopelícula; la persistencia es dependiente de la dosis del antibiótico y del tiempo de duración del ataque.
- Solos o en combinación, estos factores son usados para explicar la supervivencia de las bacterias dentro de estas comunidades ⁽²⁰⁾.

1.5.4 Resistencia natural a antibióticos

En las biopelículas formadas por *Pseudomonas* se ha podido demostrar un sinergismo entre la difusión retardada del antibiótico y la degradación de este, ya que la matriz de exopolisacáridos puede actuar como una barrera retardando la difusión del antimicrobiano y en su interior, enzimas semejantes a las β -lactamasas lo destruirán, logrando así, una resistencia efectiva.

Otro aspecto a considerar en la difusión del antimicrobiano a través de la biopelícula es la heterogeneidad de su estructura, la membrana externa de las bacterias gramnegativas, formada principalmente por lipopolisacárido, permite la difusión de solutos hidrofílicos pequeños y tiene muy baja permeabilidad para los compuestos hidrofóbicos, esta permeabilidad depende principalmente de las porinas, que son proteínas formadoras de poros con una baja especificidad, y de los sistemas de transporte específicos.

Sin embargo, la resistencia a antibióticos intrínseca como la adquirida, dependen principalmente de la presencia de un gran número de transportadores que secretan estos compuestos al exterior de la célula. El mayor número de estos transportadores se agrupan en dos familias, según su parecido estructural, una de ellas está formada por los sistemas llamados eflujo, y la otra se denomina MFS (superfamilia del facilitador mayor). Los sistemas eflujo están formados por tres proteínas, un intercambiador droga-protón, presente en la membrana interna, una proteína de membrana externa que parece formar un canal y una proteína periplásmica que une a las dos proteínas membranales ⁽²¹⁾.

1.6.- Biopelículas y enfermedades

Actualmente las enfermedades infecciosas por bacterias ubicuas han cobrado interés debido a su capacidad de producir enfermedades crónicas que responden escasamente a los tratamientos con antibióticos y no pueden prevenirse mediante inmunización. Entre las enfermedades en que se ha logrado una asociación directa con las infecciones provenientes de biopelículas están: otitis media, neumonía en pacientes con fibrosis quística, endocarditis, periodontitis, caries dental, osteomielitis e infecciones asociadas con dispositivos médicos, entre otras. Los principales microorganismos

relacionados con estos procesos son: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus aureus*, cocos grampositivos, bacterias anaerobias gramnegativas y algunas especies de hongos que se asocian con las bacterias que pertenecen al género *Candida* y *Aspergillus* ⁽²²⁾

TABLA 2. Infecciones humanas relacionadas con la formación de biopelículas ⁽²²⁾

<i>Enfermedad-infección</i>	<i>Microorganismo responsable</i>
Fibrosis quística (neumonía)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>A. fumigatus</i>
Otitis media	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Periodontitis, caries dental, gingivitis	<i>Streptococcus</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Peptostreptococcus</i>
Prostatitis	Bacterias anaerobias gramnegativas <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Serratia</i> , <i>E. faecalis</i> .
Endocarditis valvular	Bacterias gramnegativas <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Candida</i> , <i>Streptococcus</i>
Fascitis necrotizante	Estreptococos del grupo A
Osteomielitis	<i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Infecciones nosocomiales	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>A. israelii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>K. pneumoniae</i>

2. Género *Pseudomonas*

2.1. Definición y morfología

Pseudomonas es un género de bacilos rectos o ligeramente curvados, que se mueven por medio de flagelos polares, no esporulados, Gram negativos, oxidasa positivos, aerobios estrictos aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones. El catabolismo de los glúcidos se realiza por la ruta de Etner-Doudoroff y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Algunos miembros del género son psicrófilos, mientras que otros sintetizan sideróforos fluorescentes de color amarillo-verdoso con gran valor taxonómico ⁽²²⁾.

2.2. Clasificación científica

TABLA 3. CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA ⁽³³⁾

Dominio	Bacteria	
Filo	<i>Proteobacteria</i>	
Clase	<i>Gamma Proteobacteria</i>	
Orden	<i>Pseudomonales</i>	
Familia	<i>Pseudomonadaceae</i>	
Género	<i>Pseudomonas</i>	
Especie	<i>aeruginosa</i>	<i>mallei</i>
	<i>fluorescens</i>	<i>maltoiphilia</i>
	<i>fragi</i>	<i>acidovorans</i>
	<i>putida</i>	<i>alcaligenes</i>
	<i>syringae</i>	<i>testosteroni</i>
	<i>denitrificans</i>	<i>vesicularis</i>
	<i>oleovorans</i>	<i>diminuta</i>
	<i>phaseolica</i>	<i>solanacearum</i>
	<i>stutzeri</i>	<i>marginalis</i>
	<i>pseudoalcaligenes</i>	<i>sachorophila</i>

2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Son bacilos gramnegativos, rectos o levemente curvos y aerobios estrictos; muchas cepas son móviles por medio de uno o más flagelos polares; utilizan glucosa y otros hidratos de carbono en forma oxidativa y son citocromo oxidasa positiva ⁽²²⁾.

2.4 Hábitat

Pseudomonas aeruginosa es un género verdaderamente ubicuo, lo cual parece ser consecuencia de los simples requerimientos nutritivos que posee, del rango de compuestos de carbón que utiliza, y de su gran adaptabilidad genética y metabólica.

Las *Pseudomonas aeruginosa* pueden vivir en numerosos hábitats, que van desde diversos tipos de ambientes acuáticos y terrestres, hasta tejidos diversos de animales y plantas, incluyendo frutas y verduras; por lo tanto el hábitat primario es ambiental. Esencialmente, cualquier hábitat con un rango de temperatura de 4 – 42 °C, un pH comprendido entre 4 – 8 y que contenga compuestos orgánicos simples o complejos, es un hábitat potencial para las *Pseudomonas aeruginosa*; así pues, ellas se encuentran en suelos y aguas que presentan unas condiciones aerobias, mesófilas y pH neutro.

Debido a que la mayoría de las especies de este género son aerobias estrictas, el oxígeno es aparentemente casi el único requerimiento obligado para la colonización de un ambiente por *Pseudomonas aeruginosa* ⁽²³⁾.

2.5 Factores de virulencia

2.5.1. Alginato

El alginato es un exopolisacárido mucoide que permite la formación de biopelículas, restringe la difusión de antibióticos y protege a células embebidas contra los mecanismos de defensa antibacteriana.

El alginato es un copolímero lineal y parcialmente acetilado formado por unidades de ácido manurónico y ácido gulurónico unidos por enlaces β (1-4). Sólo dos géneros, *Pseudomonas* y *Azotobacter*, producen alginato; según estudios realizados el primero produce mayor cantidad de alginato.

El alginato es un importante factor de virulencia, la conversión de la forma no mucoide a la forma mucoide de la *Pseudomonas aeruginosa* genera infección en pacientes con fibrosis quística que se asocia con una disminución de la función pulmonar y la supervivencia. Los genes algD, alg8, alg44, algK, algE, algG, algX, algL, algI, algJ, algF, y algA están implicados en la biosíntesis de alginato, el gen alg8 es el gen más importante en la

biosíntesis porque se encarga de la sobreproducción del alginato. La ruta de la biosíntesis de alginato se puede dividir en cuatro diferentes etapas: (i) síntesis de sustrato precursor, (ii) polimerización y la transferencia de membrana citoplasmática, (iii) modificación periplásmico, y (iv) la exportación a través de la membrana externa ⁽²⁴⁾.

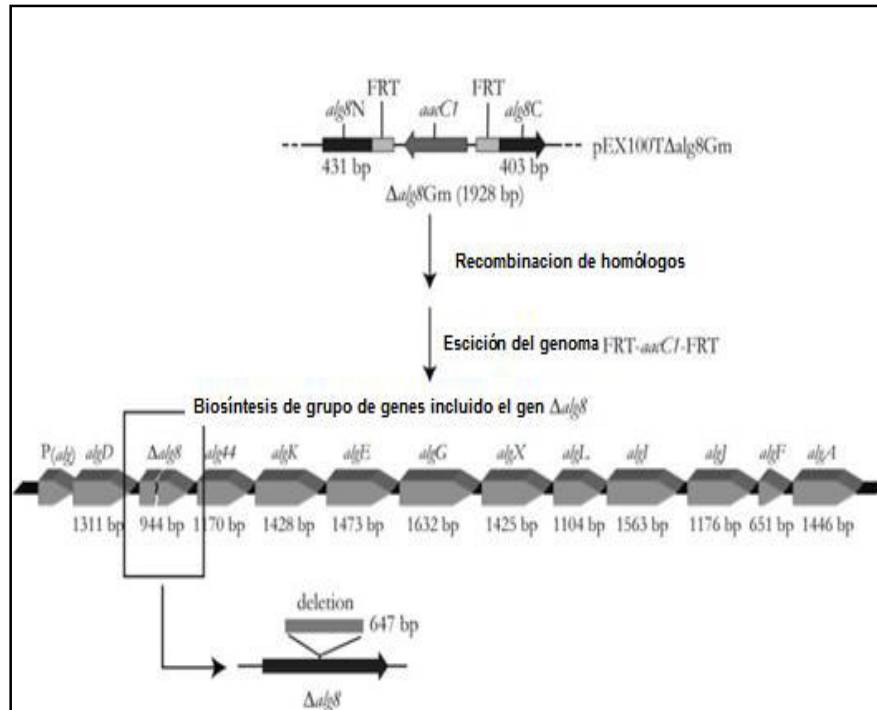


FIGURA 5: GEN ALG8 Y LA BIOSÍNTESIS DEL ALGINATO ⁽²⁴⁾

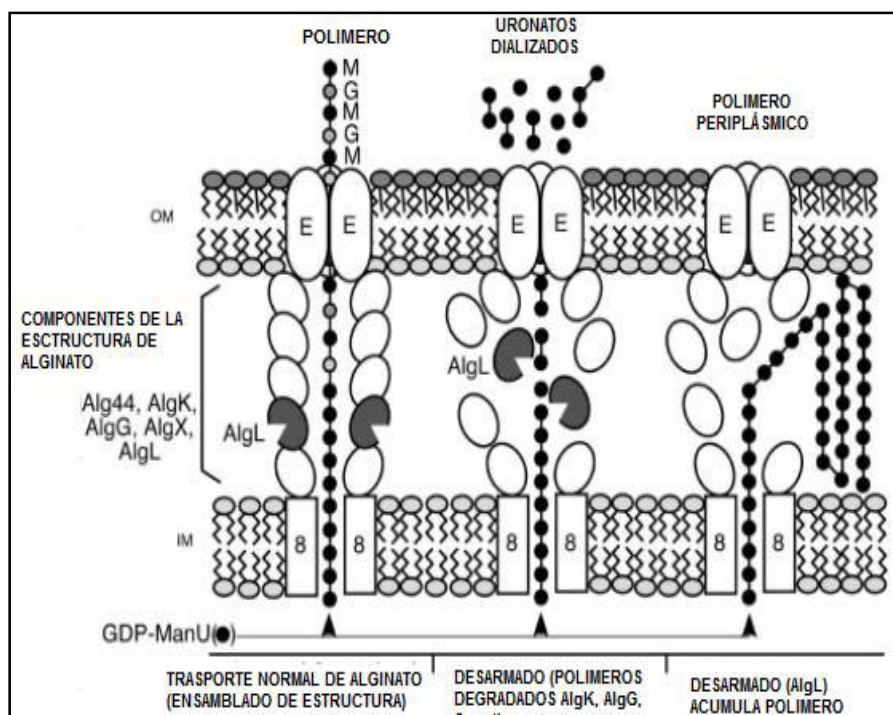


FIGURA 6. BIOSÍNTESIS DEL ALGINATO ⁽²⁴⁾

2.5.2. Píocianina

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista humano que causa infecciones graves, muchos metabolitos secundarios son secretados a lo largo de su crecimiento, los cuales forman parte de los factores de virulencia entre ellos se indica a las toxinas, proteasa, hemolisinas y fenazina. La píocianina es el principal compuesto producido por la fenazina, la cual es el principal factor de virulencia. Esta fenazina producida por *Pseudomonas aeruginosa* en fibrosis quística pulmones inhibe la función ciliar de células epiteliales respiratorias y pueden alterar el sistema inmune del huésped y la respuesta inflamatoria, provocando la apoptosis de los neutrófilos. La píocianina actúa como la señal final en el quorum de detección (QS) en cascada del sistema y regula al menos 22 genes en *P. aeruginosa*.

Dos operones homólogos forman parte en la síntesis de compuestos de fenazina en *P. aeruginosa*, *phzA1B1C1D1G1* (*phzA1*) y *phzA2B2C2D2G2*

(phzA2), la expresión de phzA1 representa la mayor parte de la producción de fenazina ⁽²⁵⁾.

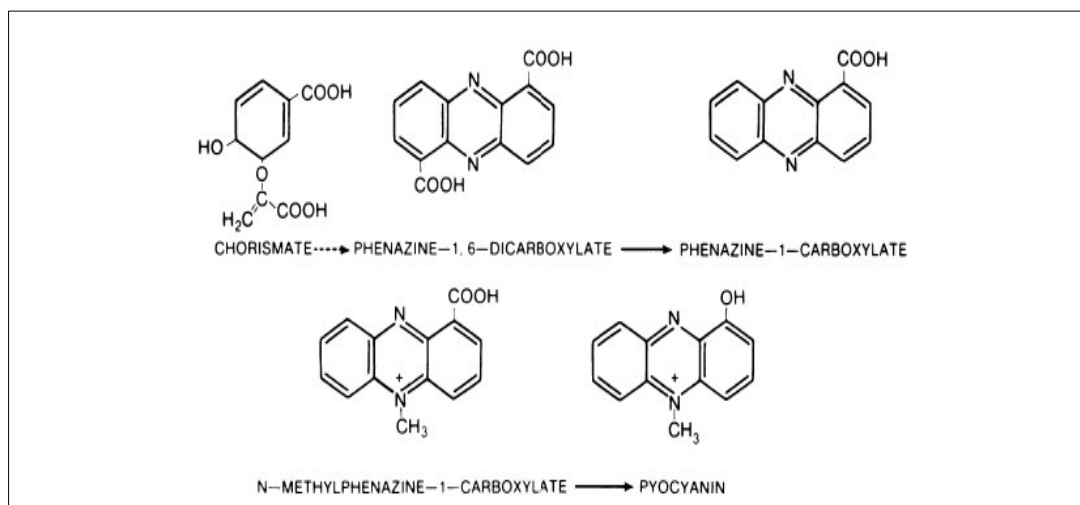


FIGURA 7. MECANISMO PROPUESTO PARA LA SINTESIS DE PIOCIANINA, EN *P. aeruginosa* ⁽²⁶⁾

2.6 *Pseudomonas aeruginosa* y la formación de biopelículas

Como ya se ha comentado anteriormente las biopelículas está compuesto por la masa celular, la matriz extracelular y los canales o espacio intercelular. Recientemente se ha reportado que los ramnolípidos tienen un papel importante en la formación de estos microcanales, así como también la matriz extracelular está constituida en parte por alginato.

2.7 *Pseudomonas aeruginosa* en el campo hospitalario

Representa un problema importante de salud pública en centros hospitalarios, especialmente cuando se trata de pacientes inmunocomprometidos. Una vez que se establece la infección, produce una serie de compuestos tóxicos que causan no sólo daño tisular extenso sino adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune. Entre las proteínas que intervienen en la infección encontramos las exotoxinas A y S, así como enzimas hidrolíticas que degradan las membranas y el tejido conjuntivo de diversos órganos. Esta

situación se ve agravada por la dificultad para tratar las infecciones, ya que esta bacteria presenta una muy alta resistencia natural a distintos antibióticos⁽²⁷⁾. Colonizan eficientemente el tracto respiratorio y a medida que progresa la infección se seleccionan derivados mucoides de la bacteria que producen grandes cantidades del exopolisacárido alginato. Una vez que se establece la infección en los pulmones de pacientes con fibrosis quística, estos están en la etapa terminal de la enfermedad⁽²⁸⁾.

3. MEROPENEM

El meropenem es un carbapenem semi-sintético químicamente similar a imipenem, con un grupo metilo en C1 y un grupo dimetil-carbomoiipirrolidinetio en C2 que sustituye a la cadena lateral tio-alquílica del imipenem, aumentando la actividad sobre bacterias gramnegativas.

3.1 Farmacodinamia

Meropenem, como el resto de los carbapenémicos, inhibe la síntesis de la pared bacteriana, en la fase tercera y última de la misma, de manera similar a otros antibióticos β -lactámicos. Pasa fácilmente a través de la pared de la mayoría de las bacterias grampositivas y gramnegativas debido a su bajo molecular, hidrófília, y a que es una sustancia anfótera, alcanzando las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), que son su diana de actuación, poniendo, además, en marcha las enzimas proteolíticas bacterianas denominadas autolisinas. Tiene gran afinidad por las PBP 2, 3 y 4 de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; y PBP 1, 2 y 4 de *Staphylococcus aureus*.

El antibiótico no se involucra en la transglucosidación, sino que cataliza exclusivamente las reacciones DD-carboxipeptidasa y DD-endopeptidasa,

facilitando la lisis de bacteria, siendo su efecto bactericida. Por otra parte es muy resistente a la degradación por las β -lactamasas bacterianas

Meropenem tiene actividad moderada in vitro sobre bacilos gramnegativos no fermentadores. La CMI₉₀ para *P. aeruginosa* es de 4 mg/L.

3.2 Farmacocinética

El meropenem se administra por vía intravenosa. Después de una inyección el meropenem se distribuye en la mayor parte de los tejidos y fluidos incluyendo el líquido cefalorraquídeo. Al final de una infusión de una dosis única de 500 mg, las concentraciones plasmáticas oscilan entre los 14-26 μ g/ml, mientras que la dosis de 1000 mg produce unos niveles entre 39-58 μ g/ml.

Después de la inyección de un bolo intravenoso de 5 min de una dosis de 500 mg, las concentraciones plasmáticas máximas son de unos 45 mg/ml, mientras que después de una dosis de 1000 mg llegan a los 112 mg/ml. El meropenem se une poco (2%) a las proteínas del plasma.

El meropenem se metaboliza mínimamente produciendo un metabolito inactivo. Aproximadamente el 70% de la dosis se excreta en la orina en 12 horas. En los pacientes con la función renal normal, la semi-vida de eliminación es de 1.2 horas, aumentando hasta las 10 horas en los pacientes con insuficiencia renal. En los sujetos con la función renal normal, no se produce acumulación del fármaco cuando se administra en dosis de 500 mg i.v. (intravenosa) cada 8 horas o en dosis de 1000 mg cada 6 horas ^(23,29).

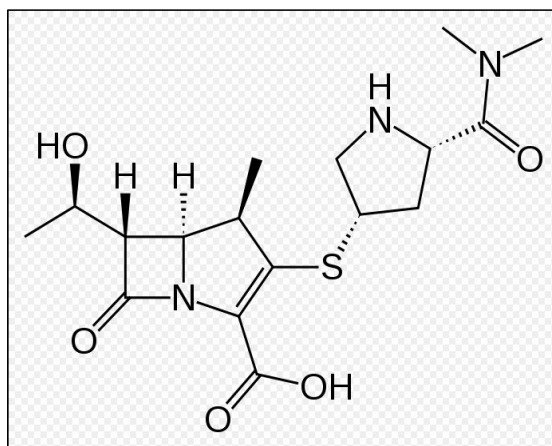


FIGURA 8. Estructura química del meropenem ⁽²⁸⁾

TABLA 4. Criterios para establecer la categoría de diferentes bacterias a la acción del meropenem (CLSI)

Microorganismos	Cepas sensibles (CMI mg/L - Ø mm)		Cepas intermedias (CMI mg/L - Ø mm)		Cepas resistentes (CMI mg/L - Ø mm)	
Bacterias anaerobias	≤ 4	-	8	-	≥ 16	-
<i>Enterobacteriaceae</i>	≤ 4	≥ 16	8	14-15	≥ 16	≤ 13
<i>P. aeruginosa</i>	≤ 4	≥ 16	8	14-15	≥ 16	≤ 13
<i>B. cepacia</i>	≤ 4	≥ 20	8	16-19	≥ 16	≤ 15
<i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 4	≥ 16	8	14-15	≥ 16	≤ 13
<i>Haemophilus</i> spp.	≤ 0,5	≥ 20	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i> spp.	≤ 0,5		-	-	-	-
<i>N. meningitidis</i>	≤ 0,25	≥ 30	-	-	-	-

III. PARTE EXPERIMENTAL

El presente trabajo fue realizado en el Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiológica y Biotecnológica “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Se analizaron un total de 80 cepas aisladas de pacientes de los Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen y Edgardo Rebagliati Martins recolectadas durante el periodo de febrero a mayo del 2013 y de julio a setiembre del 2014.

1. Material biológico

- 80 Cepas hospitalarias de *Pseudomonas aeruginosa* del Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins y del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (No formadoras de biopelículas).

2. Materiales, equipos y reactivos

Materiales

- Placas Petri estériles descartable (15 x 100 mm)
- Probetas de 100 mL ((PIREX)
- Tubos de Ensayo de vidrio estériles de 10 mL (PIREX)
- Tubos de plástico de 10 mL con tapa rosca
- Pipetas estériles de 5, 10 y 20mL (PIREX)
- Tips estériles de 1000 µL y 100 µL

- Asa de Kohle
- Micropipeta de 10 – 100 µL
- Micropipeta de 200-1000 µL
- Pinzas estériles

Reactivos

- Caldo Tripticasa de Soya (TSB) (MERCK)
- Agar Tripticasa de Soya (TSA) (MERCK)
- Agar Cetrimide (MERCK)
- Agar Mueller Hinton (MERCK)
- Caldo *Pseudomonas* Broth (PB)
- Suero fisiológico
- Solución salina fisiológica (0.9 %)
- Solución de cristal violeta al 1 %
- Cloroformo
- Bórax
- m-hidroxidifenil
- Hidróxido de sodio 0.5%
- Ácido sulfúrico concentrado
- Agua destilada
- Meropenem estándar (sigma)

Equipos

- Autoclave digital
- Estufa de 37° C
- Espectrofotómetro UV-Visible

- Balanza Analítica
- Sonicator
- Vortex
- Mechero de Bunsen
- Refrigeradora

3. Metodología de trabajo

3.1 Recolección de muestras

Fueron recolectadas 80 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en viales estériles con 5mL de Agar Tripticasa de Soya (TSA) procedentes de aislamientos de fluidos biológicos y secreciones de pacientes de los Hospitales Nacionales Edgardo Rebagliati Martins y Guillermo Almenara Irigoyen.

La identificación de las cepas fue realizada por el laboratorio de Microbiología de los Hospital Nacional Edgardo Rebagliati Martins y Guillermo Almenara Irigoyen con paneles MICROSCAN®, los cuales están diseñados para determinar la sensibilidad a agentes antimicrobianos y la identificación a nivel de especie de bacilos gramnegativos aerobios y anaerobios facultativos.

3.2. Evaluación de la producción de piocianina en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

Para la determinación de producción de piocianina de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, las muestras fueron sembradas en agar selectivo Cetrimide e incubadas a 35°C por 24 horas en el laboratorio de Microbiología del Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiológica y Biotecnológica “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.3 Selección de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* formadoras de biopelículas

No todas las bacterias tienen la capacidad de formar biopelículas, es por esto que se tuvo que realizar la selección de las cepas que presentaban esta característica. Se trabajó para esta evaluación con el Método O'Toole-Kolter⁽²³⁾.

3.3.1. Método O'Toole-Kolter

La formación de biopelículas en los tubos de ensayo se realizó de la siguiente manera: se tomaron 2 mL de la dilución 1:100 de los inóculos estandarizados, se incubaron en tubos de vidrio de borosilicato (BS) entre 35 a 37°C por 48h. Los tubos fueron lavados con suero fisiológico y teñidos con 2,4 mL de cristal violeta al 1% e incubados por 30 min a temperatura ambiente, luego se lavaron los tubos con agua destilada y finalmente se dejaron secar a temperatura ambiente. Las biopelículas que se visualizaron se clasificaron como mayor, moderada, poca formación de biopelícula o negativa (no formadora de biopelícula), y pudieron ser cuantificadas mediante la adición de 2 mL de etanol al 95% y midiendo la DO (densidad óptica) del cristal violeta disuelto. La cuantificación se obtuvo de forma directa ya que la coloración presentada por el tubo de ensayo era directamente proporcional a la cantidad de biopelícula producida⁽²³⁾.

3.4 Ensayo para la cuantificación de piocianina

El ensayo se basa en la absorbancia de piocianina a 520 nm en solución ácido. Se preparó dos baterías de 60 cepas cada grupo de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, se inoculó a las cepas en 5 mL de Caldo *Pseudomonas* Broth (PB), con la diferencia que a uno de los grupos se le agregó meropenem a la

concentración de 10µg a cada tubo, luego se incubó a 37°C por 48h para maximizar la producción de piocianina, luego se agregó 3 mL de cloroformo, se incubó a 37°C por 2 horas y después se agregó 1 mL de 0,2 N HCl dando una solución de coloreada. La absorbancia de ambos grupos se midió a 520 nm. Las concentraciones, se expresó como microgramos de piocianina producidos por mililitro del cultivo, se determinó la concentración multiplicando la densidad óptica a 520 nm por el factor de 17.072, según referencia. ⁽²⁶⁾

3.5 Ensayo para la cuantificación de alginato

Se preparó dos baterías de 60 cepas cada grupo de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, se inoculó la cepa en 2mL de caldo tripticasa de soya (TSB), con la diferencia que a uno de los grupos se le agregó meropenem a la concentración de 10µg a cada tubo de ensayo, luego se incubó a 37°C por 48h, se centrifugó a 2000 rpm por 10 min se eliminó el sobrenadante y al pellet se le agregó 5mL de solución salina y se homogenizó por 1 min luego se llevó a baño maría a 56°C por 5 min, se centrifugó a 2000 rpm por 20 min, del sobrenadante se tomó 200µL, se le agregó 1.2 mL de bórax luego se refrigeró por 20 min, se le llevó al vortex seguidamente al baño maría (100°C por 5 min) luego al hielo, por último se le agregó 20µL m-hidroxidifenil, agitar y fue leído a 520nm. En el caso del blanco se realizó el mismo procedimiento con la diferencia que se sustituyó el m-hidroxidifenil por el NaOH 0.5% ⁽²⁴⁾.

IV. RESULTADOS

1. Resultado de las cepas *Pseudomonas aeruginosa* formadoras de piocianina.

TABLA 5. FORMACIÓN DE PIOCIANINA EN CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

CEPAS	CRECIMIENTO EN CETRIMIDE	PRESENCIA DE PIOCIANINA
Cepa N°1	+	+
Cepa N°2	+	+
Cepa N°3	+	+
Cepa N°4	+	+
Cepa N°5	+	-
Cepa N°6	+	+
Cepa N°7	+	-
Cepa N°8	+	+
Cepa N°9	+	+
Cepa N°10	+	-
Cepa N°11	+	+
Cepa N°12	+	+
Cepa N°13	+	-
Cepa N°14	+	+
Cepa N°15	+	+
Cepa N°16	+	-
Cepa N°17	+	+
Cepa N°18	+	+
Cepa N°19	+	+
Cepa N°20	+	-
Cepa N°21	+	+
Cepa N°22	+	+
Cepa N°23	+	+
Cepa N°24	+	-
Cepa N°25	+	+
Cepa N°26	+	+
Cepa N°27	+	+
Cepa N°28	+	-
Cepa N°29	+	+
Cepa N°30	+	-
Cepa N°31	+	+
Cepa N°32	+	+
Cepa N°33	+	-
Cepa N°34	+	+
Cepa N°35	+	+
Cepa N°36	+	+
Cepa N°37	+	-
Cepa N°38	+	+
Cepa N°39	+	+
Cepa N°40	+	+
Cepa N°41	+	+
Cepa N°42	+	+

Cepa N°43	+	+
Cepa N°44	+	+
Cepa N°45	+	-
Cepa N°46	+	+
Cepa N°47	+	+
Cepa N°48	+	-
Cepa N°49	+	+
Cepa N°50	+	+
Cepa N°51	+	+
Cepa N°52	+	+
Cepa N°53	+	+
Cepa N°54	+	-
Cepa N°55	+	+
Cepa N°56	+	+
Cepa N°57	+	+
Cepa N°58	+	+
Cepa N°59	+	-
Cepa N°60	+	+
Cepa N°61	+	+
Cepa N°62	+	+
Cepa N°63	+	+
Cepa N°64	+	-
Cepa N°65	+	+
Cepa N°66	+	+
Cepa N°67	+	+
Cepa N°68	+	-
Cepa N°69	+	+
Cepa N°70	+	+
Cepa N°71	+	-
Cepa N°72	+	+
Cepa N°73	+	+
Cepa N°74	+	-
Cepa N°75	+	+
Cepa N°76	+	+
Cepa N°77	+	+
Cepa N°78	+	+
Cepa N°79	+	-
Cepa N°80	+	+

- Crecimiento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y formación de piocianina : +
- No formación de piocianina: -

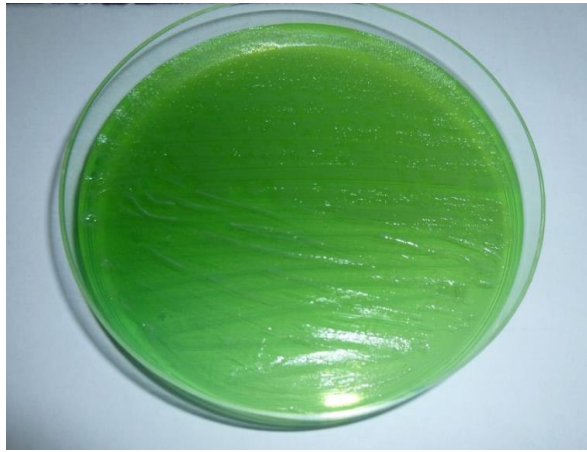


FIGURA 9. AGAR CETRIMIDE

- Se obtuvo el 75% (60/80) de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de piocianina.

2. Resultado de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* formadoras de biopelícula

- Se observó que el 75 % (60/80) de las cepas recolectadas de *Pseudomonas aeruginosa* son formadoras de biopelícula, el resultado se obtuvo de forma directa ya que la coloración presentada por el tubo era directamente proporcional a la cantidad de biopelícula producido; mientras que el 25 % de las cepas restantes no presentó coloración en el tubo, como control negativo se utilizó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Cepa no formadora de biopelícula).



FIGURA 10. *Pseudomonas aeruginosa* formadora de biopelícula



FIGURA 11. *Pseudomonas aeruginosa* no formadora de biopelícula

TABLA 6. RESULTADOS DE CEPAS FORMADORAS DE BIOPELÍCULAS EN *Pseudomonas aeruginosa*

CEPAS	MEDIO KIA	CRECIMIENTO EN CETRIMIDE	FORMADORAS DE BIOPELICULAS
Cepa N°1	+	+	++
Cepa N°2	+	+	+
Cepa N°3	+	+	+
Cepa N°4	+	+	+++
Cepa N°5	+	+	-
Cepa N°6	+	+	++
Cepa N°7	+	+	-
Cepa N°8	+	+	++
Cepa N°9	+	+	+
Cepa N°10	+	+	-
Cepa N°11	+	+	+++
Cepa N°12	+	+	+
Cepa N°13	+	+	-
Cepa N°14	+	+	+
Cepa N°15	+	+	++
Cepa N°16	+	+	-
Cepa N°17	+	+	+++
Cepa N°18	+	+	++
Cepa N°19	+	+	++
Cepa N°20	+	+	-
Cepa N°21	+	+	+
Cepa N°22	+	+	+
Cepa N°23	+	+	+++
Cepa N°24	+	+	-
Cepa N°25	+	+	+
Cepa N°26	+	+	++
Cepa N°27	+	+	++
Cepa N°28	+	+	-
Cepa N°29	+	+	+
Cepa N°30	+	+	-
Cepa N°31	+	+	+++
Cepa N°32	+	+	+++
Cepa N°33	+	+	-

Cepa N°34	+	+	++
Cepa N°35	+	+	+++
Cepa N°36	+	+	+
Cepa N°37	+	+	-
Cepa N°38	+	+	+
Cepa N°39	+	+	+++
Cepa N°40	+	+	+
Cepa N°41	+	+	++
Cepa N°42	+	+	++
Cepa N°43	+	+	+
Cepa N°44	+	+	+
Cepa N°45	+	+	-
Cepa N°46	+	+	+++
Cepa N°47	+	+	++
Cepa N°48	+	+	-
Cepa N°49	+	+	+
Cepa N°50	+	+	++
Cepa N°51	+	+	+
Cepa N°52	+	+	+
Cepa N°53	+	+	+
Cepa N°54	+	+	-
Cepa N°55	+	+	+++
Cepa N°56	+	+	++
Cepa N°57	+	+	+
Cepa N°58	+	+	+
Cepa N°59	+	+	-
Cepa N°60	+	+	+++
Cepa N°61	+	+	++
Cepa N°62	+	+	+
Cepa N°63	+	+	++
Cepa N°64	+	+	-
Cepa N°65	+	+	+
Cepa N°66	+	+	+++
Cepa N°67	+	+	++
Cepa N°68	+	+	-
Cepa N°69	+	+	+
Cepa N°70	+	+	++
Cepa N°71	+	+	-
Cepa N°72	+	+	++
Cepa N°73	+	+	+
Cepa N°74	+	+	-
Cepa N°75	+	+	+
Cepa N°76	+	+	+
Cepa N°77	+	+	+
Cepa N°78	+	+	+
Cepa N°79	+	+	-
Cepa N°80	+	+	+++

Mayor formación de biopelícula: +++

Moderada formación de biopelícula: +++

Débil formación de biopelícula: +++

No formadora de biopelícula: -

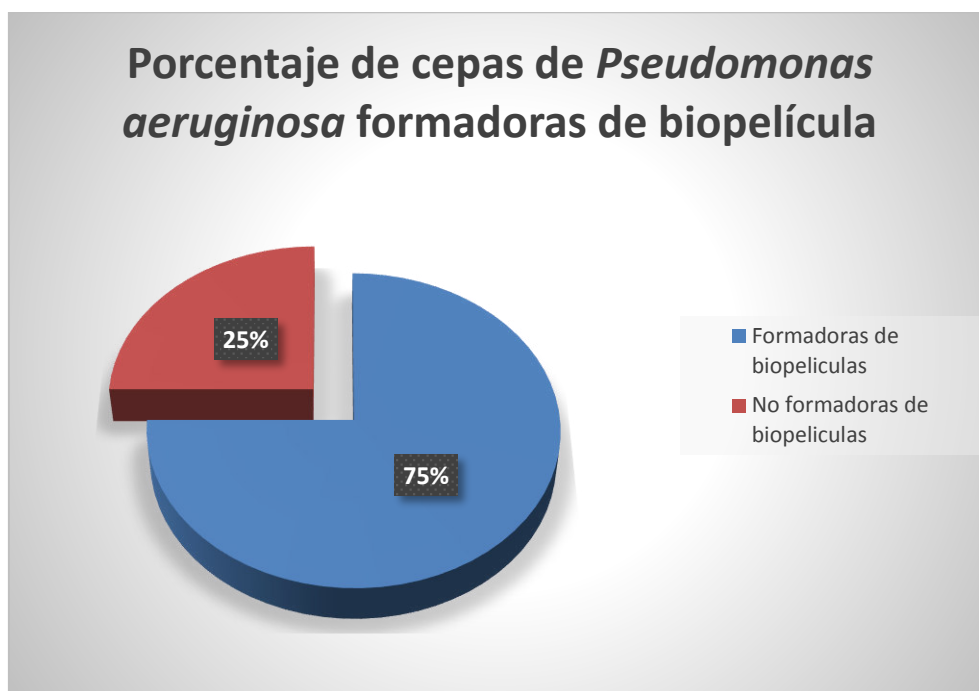


FIGURA 12. Cepas formadoras de biopelícula

3. Resultado de la cuantificación de piocianina

TABLA 7. Cuantificación espectrofotométrica de producción de piocianina por *Pseudomonas aeruginosa* en 60 cepas formadoras de biopelícula

CEPAS	Sin Meropenem Absorbancia ($\lambda=520$)	Producción de Piocianina ($\mu\text{g/ml}$)	Con Meropenem (10 μg) Absorbancia ($\lambda=520$)	Producción de Piocianina ($\mu\text{g/ml}$)
Cepa N°1	0.114	1.95	0.284	4.85
Cepa N°2	0.037	0.63	0.078	1.33
Cepa N°3	0.04	0.68	0.089	1.52
Cepa N°4	0.244	4.17	0.367	6.27
Cepa N°6	0.122	2.08	0.292	4.99
Cepa N°8	0.129	2.20	0.278	4.75
Cepa N°9	0.065	1.11	0.086	1.47
Cepa N°11	0.277	4.73	0.386	6.59
Cepa N°12	0.042	0.72	0.083	1.42
Cepa N°14	0.013	0.22	0.062	1.06
Cepa N°15	0.159	2.71	0.352	6.01
Cepa N°17	0.307	5.24	0.383	6.54
Cepa N°18	0.124	2.12	0.352	6.01
Cepa N°19	0.141	2.41	0.324	5.53

Cepa N°21	0.043	0.73	0.071	1.21
Cepa N°22	0.051	0.87	0.081	1.38
Cepa N°23	0.213	3.64	0.364	6.21
Cepa N°25	0.049	0.84	0.071	1.21
Cepa N°26	0.282	4.81	0.361	6.16
Cepa N°27	0.264	4.51	0.374	6.38
Cepa N°29	0.041	0.70	0.067	1.14
Cepa N°31	0.268	4.58	0.373	6.37
Cepa N°32	0.256	4.37	0.341	5.82
Cepa N°34	0.151	2.58	0.276	4.71
Cepa N°35	0.284	4.85	0.368	6.28
Cepa N°36	0.026	0.44	0.073	1.25
Cepa N°38	0.022	0.38	0.065	1.11
Cepa N°39	0.307	5.24	0.347	5.92
Cepa N°40	0.008	0.14	0.023	0.39
Cepa N°41	0.195	3.33	0.376	6.42
Cepa N°42	0.108	1.84	0.282	4.81
Cepa N°43	0.008	0.14	0.014	0.24
Cepa N°44	0.017	0.29	0.073	1.25
Cepa N°46	0.305	5.21	0.379	6.47
Cepa N°47	0.114	1.95	0.249	4.25
Cepa N°49	0.018	0.31	0.063	1.08
Cepa N°50	0.127	2.17	0.315	5.38
Cepa N°51	0.035	0.60	0.073	1.25
Cepa N°52	0.014	0.24	0.043	0.73
Cepa N°53	0.032	0.55	0.061	1.04
Cepa N°55	0.216	3.69	0.327	5.58
Cepa N°56	0.172	2.94	0.334	5.70
Cepa N°57	0.054	0.92	0.081	1.38
Cepa N°58	0.014	0.24	0.087	1.49
Cepa N°60	0.321	5.48	0.365	6.23
Cepa N°61	0.241	4.11	0.355	6.06
Cepa N°62	0.027	0.46	0.041	0.70
Cepa N°63	0.154	2.63	0.282	4.81
Cepa N°65	0.064	1.09	0.097	1.66
Cepa N°66	0.276	4.71	0.379	6.47
Cepa N°67	0.193	3.29	0.315	5.38
Cepa N°69	0.019	0.32	0.048	0.82
Cepa N°70	0.133	2.27	0.377	6.44
Cepa N°72	0.177	3.02	0.369	6.30
Cepa N°73	0.016	0.27	0.053	0.90
Cepa N°75	0.04	0.68	0.073	1.25

Cepa N°76	0.057	0.97	0.073	1.25
Cepa N°77	0.073	1.25	0.097	1.66
Cepa N°78	0.059	1.01	0.089	1.52
Cepa N°80	0.315	5.38	0.378	6.45

Las células se cultivaron durante 37° C por 48 h en 5 ml de Caldo *Pseudomonas* Broth (PB), la piocianina se reportó como microgramos de piocianina producido por mililitro de Caldo *Pseudomonas* Broth (PB).

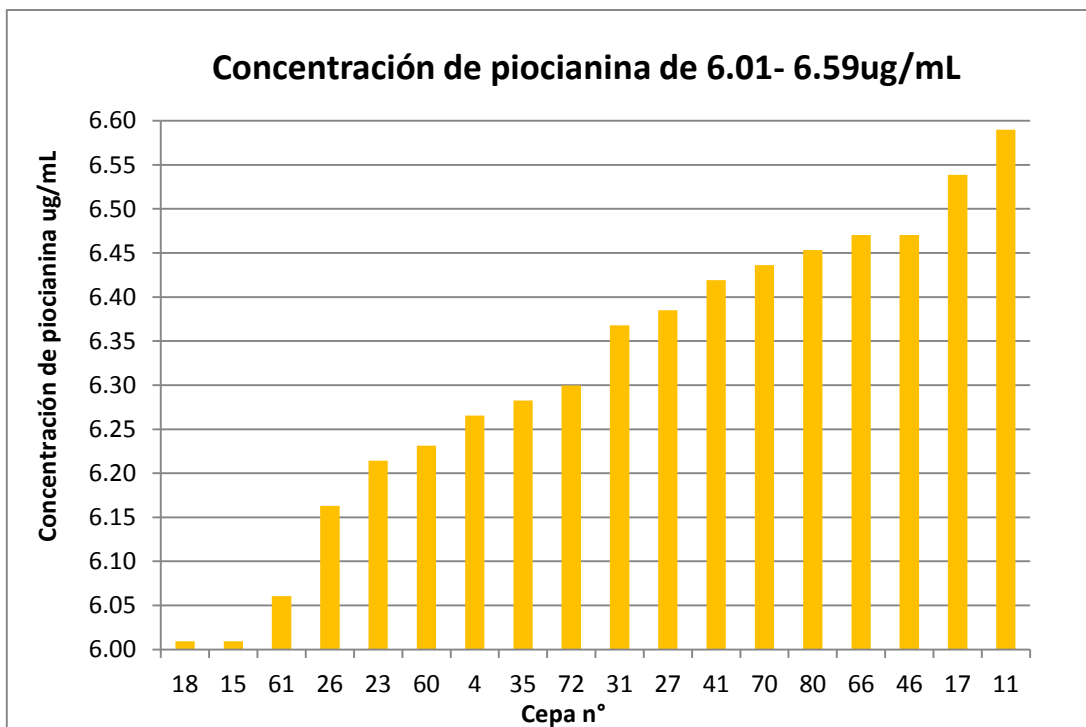


FIGURA 13. Concentración de piocianina de 6.01 – 6.59ug/mL

- Se observó que el 30% de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (18/60) evidenciaron producción de piocianina en una concentración de 6.01 ug/mL a 6.59 ug/mL en presencia de meropenem a la concentración de 10µg.

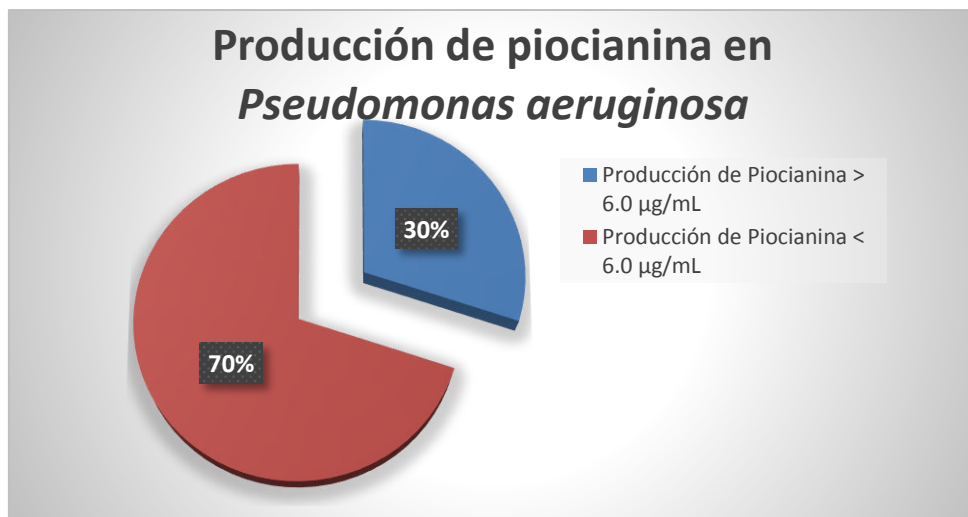


FIGURA 14. Producción de piocianina

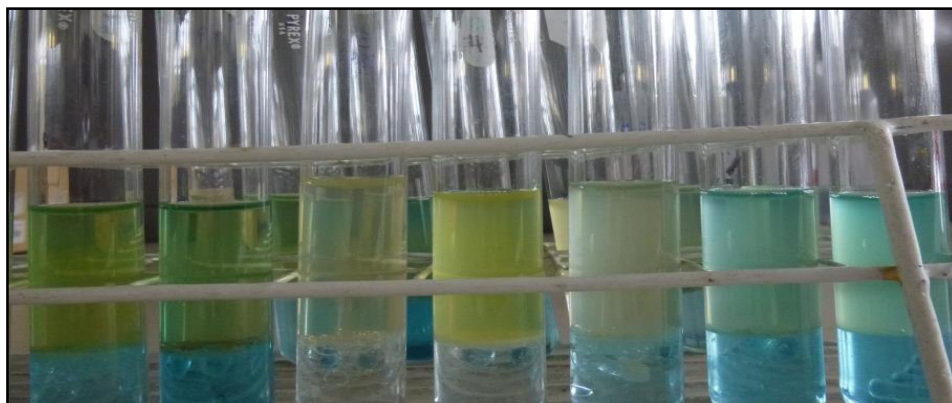


FIGURA 15. *Pseudomonas aeruginosa* con meropenem



FIGURA 16. *Pseudomonas aeruginosa* sin meropenem

4. Resultado de la cuantificación de alginato

TABLA 8. Resultados de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* formadoras de alginato

Cuantificación espectrofotométrica de producción de alginato por *Pseudomonas aeruginosa* en 60 cepas formadoras de biopelícula

CEPAS	Sin Meropenem Absorbancia ($\lambda=520$)	Con Meropenem (10 μ g) Absorbancia ($\lambda=520$)
Cepa N°1	0.134	0.301
Cepa N°2	0.094	0.113
Cepa N°3	0.091	0.205
Cepa N°4	0.322	0.498
Cepa N°6	0.233	0.434
Cepa N°8	0.203	0.390
Cepa N°9	0.117	0.235
Cepa N°11	0.405	0.698
Cepa N°12	0.147	0.267
Cepa N°14	0.168	0.289
Cepa N°15	0.295	0.515
Cepa N°17	0.425	0.718
Cepa N°18	0.304	0.448
Cepa N°19	0.213	0.526
Cepa N°21	0.195	0.287
Cepa N°22	0.149	0.257
Cepa N°23	0.481	0.734
Cepa N°25	0.169	0.294
Cepa N°26	0.316	0.472
Cepa N°27	0.337	0.463
Cepa N°29	0.153	0.247
Cepa N°31	0.487	0.672
Cepa N°32	0.434	0.682
Cepa N°34	0.324	0.469
Cepa N°35	0.494	0.699
Cepa N°36	0.181	0.282
Cepa N°38	0.194	0.275
Cepa N°39	0.454	0.621
Cepa N°40	0.198	0.269
Cepa N°41	0.354	0.492
Cepa N°42	0.339	0.524
Cepa N°43	0.159	0.297

Cepa N°44	0.197	0.272
Cepa N°46	0.429	0.679
Cepa N°47	0.258	0.315
Cepa N°49	0.187	0.248
Cepa N°50	0.285	0.354
Cepa N°51	0.192	0.218
Cepa N°52	0.196	0.257
Cepa N°53	0.163	0.297
Cepa N°55	0.327	0.593
Cepa N°56	0.311	0.527
Cepa N°57	0.189	0.216
Cepa N°58	0.238	0.259
Cepa N°60	0.427	0.607
Cepa N°61	0.362	0.459
Cepa N°62	0.135	0.258
Cepa N°63	0.299	0.357
Cepa N°65	0.183	0.216
Cepa N°66	0.587	0.715
Cepa N°67	0.263	0.379
Cepa N°69	0.126	0.249
Cepa N°70	0.241	0.438
Cepa N°72	0.224	0.373
Cepa N°73	0.176	0.251
Cepa N°75	0.154	0.287
Cepa N°76	0.116	0.263
Cepa N°77	0.192	0.256
Cepa N°78	0.227	0.296
Cepa N°80	0.428	0.762

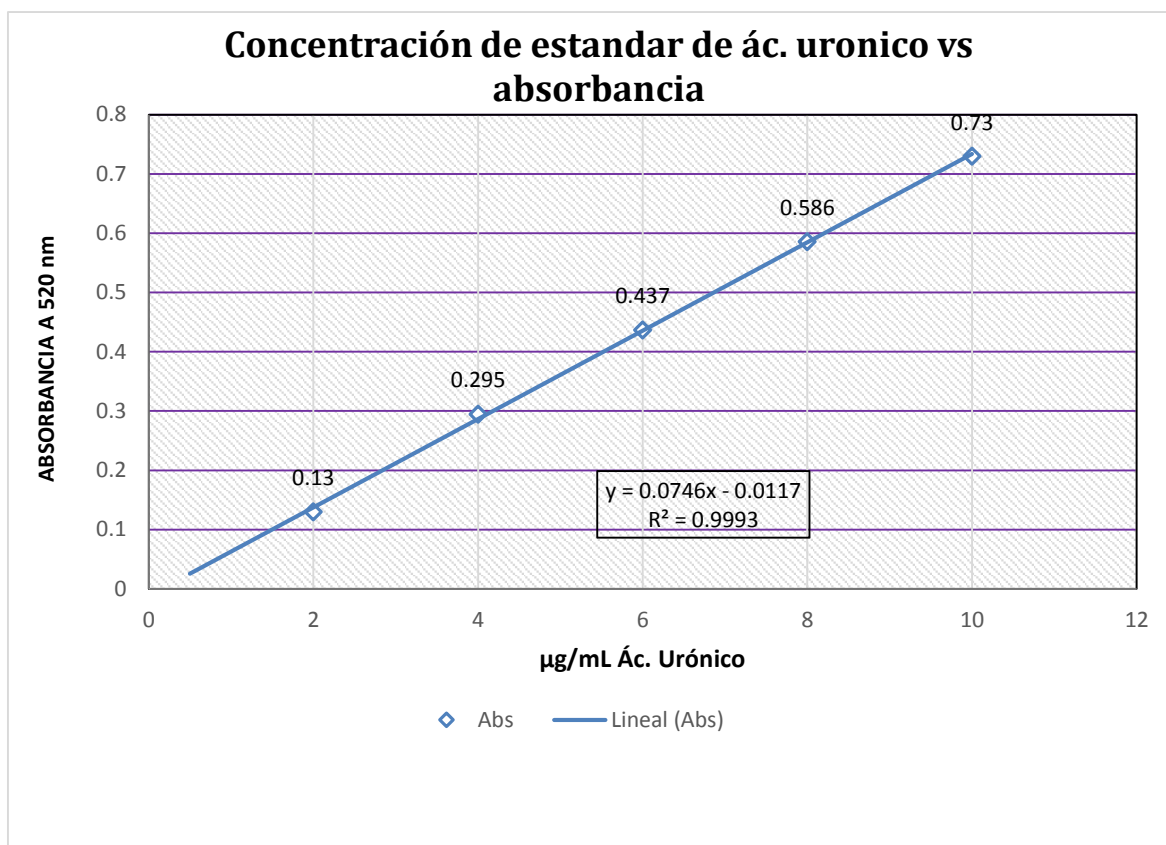


FIGURA 17. Concentración de estándar de ácido úrico vs absorbancia

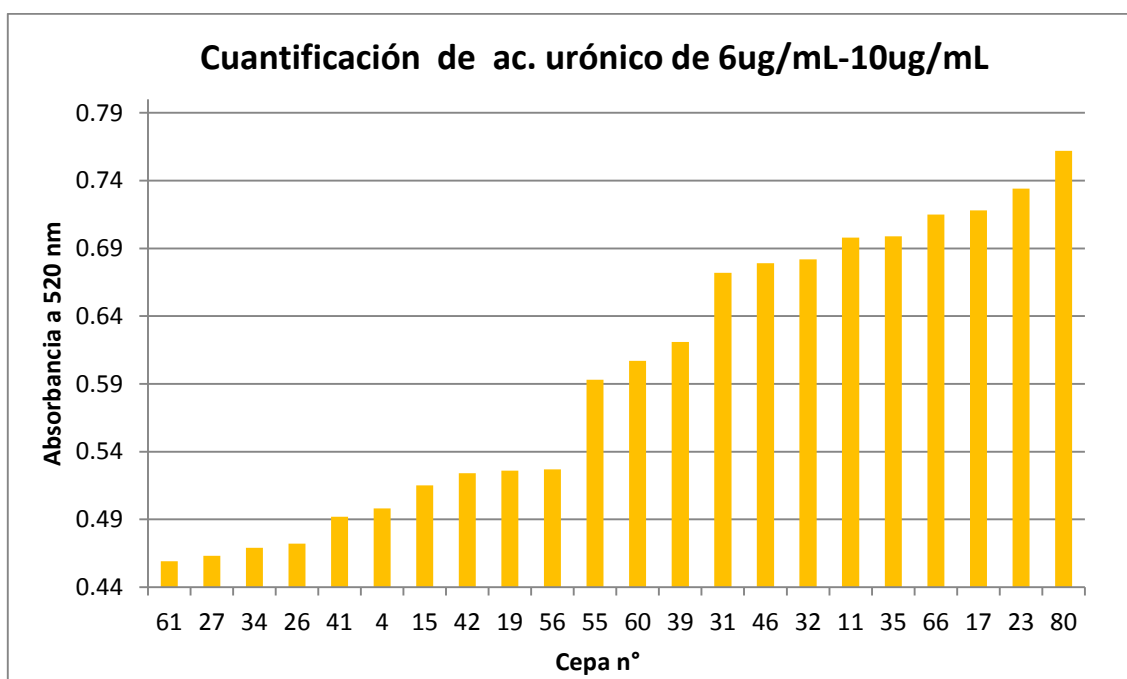


FIGURA 18. Cuantificación de ácido úrico de 6ug/mL – 10ugL

- Se observó que el 36.6% de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (22/60) se evidenciaron producción de alginato en una concentración de 6.0 ug/mL a 10 ug/mL expresado como ácido urónico en presencia de meropenem a la concentración de 10µg.

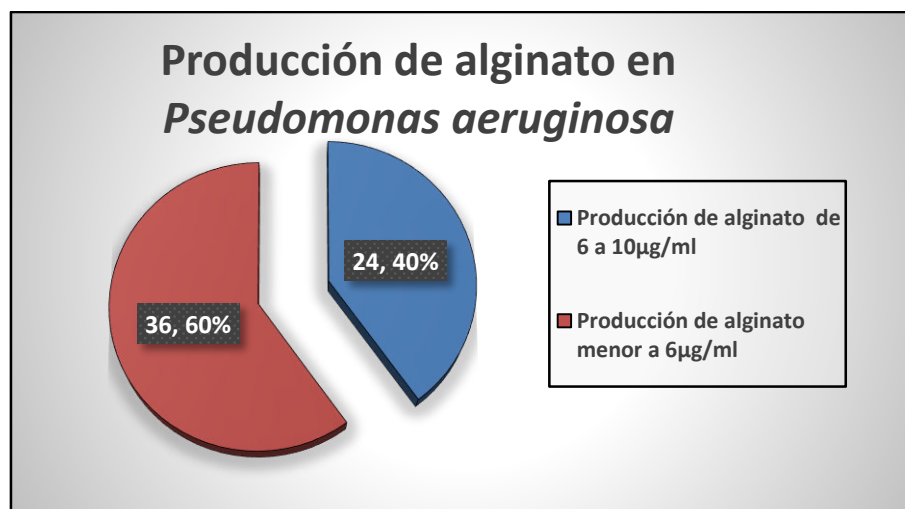


FIGURA 19. Producción de alginato en *Pseudomonas aeruginosa*

V. DISCUSIÓN

Esta investigación tuvo como objetivo principal evaluar la influencia del meropenem en la formación de piocianina y alginato por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* formadoras de biopelículas, para lo cual se trabajó con 80 aislados clínicos provenientes de dos hospitales de Nivel IV de las áreas de UCI, como secreción bronquial (neumología), heridas operatorias, dermatología secreción, etc. Para ello, una de las mejores maneras de determinar la presencia de biopelículas es por la producción de exopolisacáridos, y para evaluar la capacidad de formar biopelícula se utilizó el método del O'Toole - Kolter que se fundamenta en la tinción de las células y exopolisacáridos presentes. Los resultados obtenidos evidenciaron que el 75%(60/80 cepas) del total de aislados clínicos, son formadoras de biopelículas como lo reporta la investigación de Mathur et al ⁽³⁰⁾, quien utilizó tres métodos para la identificación de biopelículas y determinó que el método más sensible, exacto y reproducible era el método de O'Toole - Kolter a diferencia de otros métodos como el agar rojo de congo y el cultivo en placas.

De las cepas formadoras de biopelículas el 30.0 % (18/60) evidenciaron producción de piocianina en una concentración de 6.01 ug/ml a 6.59 ug/ml al enfrentarlo al meropenem y el 36.6 % (22/60) producción de alginato en concentraciones de 6 a 10 ug/ml expresados como ácido urónico al enfrentarlo al meropenem, sin embargo en ausencia de meropenem la producción de piocianina y alginato fue menor, por lo que se comprueba que el pigmento de piocianina y la producción de alginato son mecanismos de virulencia que favorecen la supervivencia de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia del antibiótico, lo cual corresponde con lo descrito en los estudios de autores

Remminghorst U, Rehm B ⁽²⁴⁾, Essar D, Eberly L, Hadero A, Crawford I ⁽²⁶⁾, Bagge N, Schuster M, Hentzer M, Ciofu O, Givskov M, Greenberg E et al⁽³¹⁾ y Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G⁽³²⁾ . Entre el alginato, piocianina y la presencia de biopelícula se observa que hay una relación directa comprobando que el alginato actúa como una matriz extracelular para permitir el establecimiento de biopelículas por las cepas de *P. aeruginosa* y es el modo más común de crecimiento en los pacientes con fibrosis quística con infecciones pulmonares crónicas, las biopelículas proporciona una protección contra el medio, el sistema inmune del huésped y principalmente ante la presencia de antibióticos.

VI. CONCLUSIONES

- De 80 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de aislados clínicos, de dos hospitales de Nivel IV se evidencio que el 75% (60/80) son productoras de biopelículas.
- 30.0 % de las cepas productoras de biopelículas evidenciaron producción de piocianina en concentraciones mayores a 6.0 ug/mL, y el 36.6 % de las cepas productoras de biopelículas evidenciaron producción de alginato en concentraciones de 6.0 ug/mL a 10.0 ug/mL al interactuar con meropenem.
- La presencia del meropenem en una concentración de 10µg en todas las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* formadoras de biopelícula incremento la concentración de piocianina y alginato.
- La ausencia del meropenem en todas las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* formadoras de biopelícula no incrementó la concentración de piocianina y alginato.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol.* 1987; 41(6): 435-464.
2. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 2002; 15(2): 167-193.
3. Caldwell DE, Atuku DC, Wilkie KP, Wivcharuk M, Karthiken S, Kobert D et al, theory vs. community theory in understating and cotpapelling the ppapeliferation of biofilms.*Adv.Dent.Res.*1997; 11 - 13.
4. Socransky SS, Haffajee AD. Biofilms dentales: objetivos terapéuticos difíciles. *Periodontol.* 2003; 3(7): 12-55.
5. Costerton JW. Biofilms: the customized microniche. *J Bacteriology.* 1994; 176(8): 2137-2142.
6. Davies DG, Chakrabarty AM, Geesey GG. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol* 1993; 59:1181-1186.
7. Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 64: 847-867.
8. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56: 187-209.
9. Landa AS. Detachment of linking film bacteria from enamel surfaces by rinses and penetration of sodium lauryl sulphate through an artificial oral biofilm. *Adv Dent Res.* 2004; 11: 528-38.

- 10.** Heitz E, Sand W, Flemming HC. Microbially influenced corrosion of materials-Scientific and technological aspects, Springer, Heidelberg. 1996; 39-54.
- 11.** Costerton JW. Overview of microbial biofilm. J. Indus Microbiol. 1995; 15: 137-140.
- 12.** O'Toole. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev. Microbiol. 2000; 54:49-79.
- 13.** Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. J Clin Periodontol. 1995; 22: 1-14.
- 14.** Piera G. Estudio del Biofilms Formacion y Consecuencias. 2003; 17-21.
- 15.** Dunne WM. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilm. Lately Clinical Microbiology Reviews. 2002; 15(2): 155-166.
- 16.** Lasa I, Del Pozo JL, Penadés JR, Leiva J. Bacterial biofilms and infection. Anales Sist. Sanit. Navar. Mayo-Agosto 2005; 28 (2): 35-49.
- 17.** Nazar J. Biofilms bacterianos. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello. 2007; 67: 61-72
- 18.** Mah T. O'Toole G. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. TMS. 2001; 9: 34-39.
- 19.** Kim L. Minireview Riddle of Biofilm Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2001; 999–1007.
- 20.** Herrera MT. Biofilm, infección, resistencia y tratamiento. Nova Enero-Diciembre. Bogota-Colombia 2004; 2(2): 2-10.

- 21.** Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985; 27: 619-624.
- 22.** Betancourth M, Botero JE, Rivera SP. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colombia médica.* 2004; 35 (3): 34-39.
- 23.** Ruiz L. *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. España. Universidad de Barcelona. Facultad de Medicina. 2007.
- 24.** Remminghorst U, Rehm B. In vitro Alginate polymerization and the Functional Role of Alg8 in Alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology.* 2006; 72: 298 – 305
- 25.** Liang H, Duan J, Sibley C, Surette M, Duan K. Identification of mutants with altered phenazine production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology.* 2011; 60: 22-34.
- 26.** Essar D, Eberly L, Hadero A, Crawford J. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology.* 1990; 172(2) 884-900.
- 27.** Sing PK, Parsek MR, Greenberg EP, Welsh J. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature.* 2002; 917: 552-555.
- 28.** Gobernando M. Meropenem: aspectos microbiológicos. *Revista Española de Quimioterapia.* 2010; 23 (supl 1): 2-17.
- 29.** Azanza, J. Meropenem aspectos farmacocinéticos, farmacodinámicos y seguridad. *Revista española de quimioterapia.* 2010; 23 (Supl 1): 18-24.

30. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2006; 24(1): 25-29.
31. Bagge N, Schuster M, Hentzer M, Ciofu O, Givskov M, Greenberg EP, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Exposed to Imipenem Exhibit Changes in Global Gene expression and *B*-Lactamase and Alginate production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; 48(4): 1175 – 1187.
32. Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New Method for Quantitative Determination of Uronic Acids. *Analytical Biochemistry*. 1973; 54: 484 – 489.
33. Koneman E. *Diagnostico Microbiológico*. Buenos Aires; Editorial médica panamericana S.A; 2008.
34. Vinckx T, Wei Q, Matthijs S, Cornelis P. The *Pseudomonas aeruginosa* oxidative stress regulator OxyR influences production of pyocyanin and rhamnolipids: protective role of pyocyanin. *Microb*. 2010; 156: 678-686.
35. Allen L, et al. Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* Induces Neutrophil Apoptosis and Impairs Neutrophil-Mediated Host Defenses In Vivo. *The Journal of Immunology*. 2005; 174: 3643-3649.
36. Dietrich L, et al. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*. 2006; 61 (5): 1308-1321.
37. Liang H, Duan J, Sibley C, Surette M, Duan K. Identification of mutants with altered phenazine production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*. 2011; 60: 22-33.
38. Mavrodi D, Bonsall R, Delaney S, Soule M. Functional Analysis of Genes for Biosynthesis of Pyocyanin and Phenazine - 1 – carboximide from

Pseudomonas aeruginosa PAO1. Journal of Bacteriology. 2001; 183(21).6454-6465.

39. Kurachi M. Studies on the Biosynthesis of Pyocyanine (I). Journal of Bacteriology. 1958; 36: 163-173.

40. Kurachi M. Studies on the Biosynthesis of Pyocyanine (II). Journal of Bacteriology. 1958; 36: 174-187.

41. Kurachi M. Studies on the Biosynthesis of Pyocyanine (III). Journal of Bacteriology. 1958; 36: 188-196.

42. Hatch R, Schiller N. Alginate Lyase Promotes Diffusion of Aminoglycosides through the Extracellular Polysaccharide of Muroid *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1998; 4: 974 – 977.

43. Jain S, Ohman D. Role of an Alginate Lyase for Alginate Transport in Muroid *Pseudomonas aeruginosa*. Infection and Immunity. 2005; 73: 6429 – 6436.

44. Ghafoor A, Hay L, Rehm B. Role of Exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Architecture. Applied and Environmental Microbiology. 2011; 8: 5238 – 5246.

45. Ciofu O, et al. Investigation of the *alg T* operon sequence in mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 115 Scandinavian patients with cystic fibrosis and in 88 *in vitro* non-mucoid revertants. Microbiology. 2008; 154: 103-113.

46. Hanlon G, et al. Reduction in Exopolysaccharide Viscosity as an Aid to Bacteriophage Penetration through *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Applied and Environmental Microbiology. 2001; 5: 2746-2753.

47. Laux D, et al. Lysophosphatidic acid inhibition of the accumulation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 alginate, pyoverdine, elastase and LasA. Microb. 2002; 148: 1709-1723.
48. Donlan, R. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerg. Infect. Dis. 2002; 8(9) Center for Disease Control and Prev. (CDC).
49. Govan JR. Deretic D. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. Microbiol Rev 1996; 60: 539-574.
50. O'Toole G, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Molecular Microbiology. 1998; 28(3), 449-461.
51. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol Microbiol. 1998; 30(2): 295-304.